

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670631

研究課題名(和文) 関節軟骨の維持・変性における酸素濃度変化の解析とその応答シグナルの探索

研究課題名(英文) Evaluating oxygen conditions and genetic regulation of osteoarthritic cartilage

研究代表者

竹下 克志 (Katsushi, Takeshita)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：30262009

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は関節軟骨が低酸素環境に存在することに着目し、変性に伴う関節軟骨の酸素濃度変化と変形性関節症への関与を調べることを目的に行われた。加齢や外科的変形性関節症モデルでは変性の進行に伴い関節軟骨の酸素濃度は上昇し、その結果HIF-1の発現が低下していることがわかった。またHIF-1が低下することでMMP13やMMP9などの変性マーカーが上昇することをin vivoとin vitroで示し、HIF-1がanti-catabolicな作用を有することを明らかにした。よって関節軟骨の酸素濃度が上昇し、HIF-1が低下することで変性マーカーが上昇し、変形性関節症が進行することがわかった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project was to investigate the changes in oxygen concentration of articular cartilage during the progression of osteoarthritis and to elucidate the molecular mechanism underlying osteoarthritis. We found that the concentration of oxygen in the articular cartilage increases during osteoarthritis and the expression of HIF-1 decreases related to the oxygen change. HIF-1 suppression caused increase of catabolic factors such as MMP13 and MMP9 both in vitro and in vivo, suggesting the anti-catabolic effect of HIF-1. Hence, the progression of osteoarthritis is related to the increase of oxygen concentration which decreases HIF-1 expression and causes catabolic factors to increase.

研究分野：整形外科

キーワード：関節軟骨 低酸素

1. 研究開始当初の背景

関節軟骨は無血管組織であり、低酸素環境におかれている。以前より細胞が低酸素環境下で生存するために低酸素誘導因子 (HIF) が重要な役割を担っていることは様々な領域で研究されてきた。整形外科領域では四肢の発生に HIF が中心的な役割を担っていることが示されており、我々も以前より HIF の研究を行い、成果を挙げている。また最近では再生医学の分野でも低酸素が軟骨誘導に有利であることが証明され低酸素と軟骨の関係が注目されている。その一方で変性疾患や関節リウマチでは関節液内の酸素濃度が低下することが知られおり、軟骨細胞に対する低酸素は不利に作用するとの報告もある。今回我々は現在までに行ってきた変形性関節症の分子メカニズム解明の手法と Laser capture microdissection (LCM) などの最新技術を用いて、酸素濃度が関節軟骨の恒常性維持や変形性関節症発症にどのように関係しているかを解析し、そこから関節軟骨の保護や再生に繋がる実用的な知見を得ることを目的に本研究を行った。

2. 研究の目的

関節軟骨は無血管組織であり、栄養および酸素は関節液から直接供給される。本研究は、他臓器に比べ低酸素な環境にある関節軟骨が恒常性を維持するために獲得した特殊な機構を探索し、関節軟骨の変性との関連についても調べ、関節軟骨における酸素濃度の果たす役割を明らかにするとともに、そこから実用的な知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 各段階の関節軟骨における酸素濃度の半定量的解析

C57/B6J マウスを用いて実験を行った。まず正常な関節軟骨が加齢によって変性していく過程で酸素濃度がどのように変化するか低酸素プローブを用いて調べた。加齢に伴う変化と外科的に半月板と内側側副靭帯を切除した変形性関節症モデルを用いて評価した。

2) 酸素濃度の変化に伴う発現遺伝子群の網羅的探索

変性軟骨と非変性軟骨を LCM を用いて、サンプリングし、mRNA を抽出・増幅する予定であったが、データが安定しなかったため、変性軟骨と非変性軟骨を徒手的に削って mRNA を回収し、逆転写後に cDNA マイクロアレイ解析を行った。

3) 候補分子の in vitro 機能解析

2) で発現の変化が確認された候補分子については in vitro で機能解析した。転写因子であれば強制発現系および siRNA を用いた抑制系のレトロウイルスやアデノウイルスを作製し、様々な細胞に遺伝子導入した。これらの細胞を低酸素インキュベーターで培養し、軟骨マーカーの動きを定量的 PCR 法と

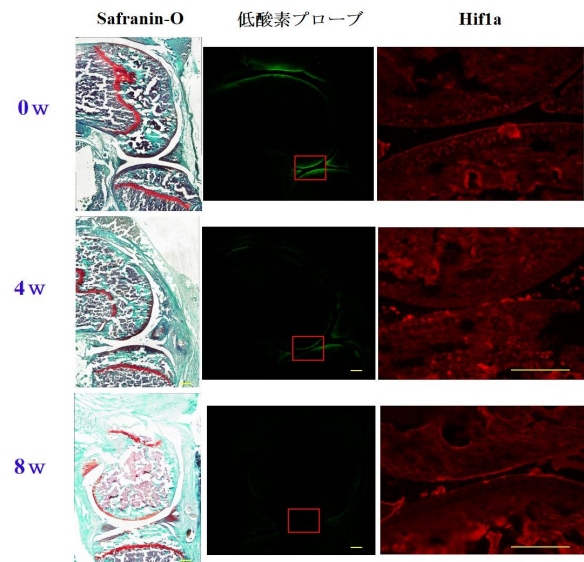
ウェスタンブロットで確認した。HIF 関連遺伝子は、1) で調べた低酸素領域と発現パターンから空間的関連性を含めてシグナル経路の解析を行った。

4. 研究成果

1) 各段階の関節軟骨における酸素濃度の半定量的解析

C57/B6J マウスに低酸素プローブを用いて加齢に伴う関節軟骨の酸素濃度変化を調査した。市販の低酸素プローブを使用したか、安定した結果が得られず、東京大学薬学部にご相談し、新開発のプローブを用いて実験を行った。

まずマウス関節軟骨にプローブを添加し、低酸素インキュベーターで動作確認すると酸素濃度依存的に発光することが確認できた。そこで IVIS を用いて体表から発光を確認したが、残念ながらわずかな発光しか捉えられず、空間分解能が低いために詳細な解析を行うことができなかった。よって、凍結切片を用いて、プローブの発光強度を調べることとした。週齢の異なるマウスにプローブを 10 μ l 関節内注射し、4 時間後に犠牲死させ、4%PFA で還流固定後に凍結包埋した。切片を作製し観察すると、加齢に伴い変性が進行し、関節軟骨の酸素濃度が上昇することがわかった。また我々が開発したマウス変形性関節症モデルを用いて、外科的に変形性関節症



を誘導した実験でも、変性の進行に伴い関節軟骨の酸素濃度は上昇していた。

2) 酸素濃度の変化に伴う発現遺伝子群の網羅的探索

1) の結果より荷重部での酸素濃度変化が最も強く、変性に伴い酸素濃度が上昇することが分かったため LMD を用いて部分的に軟骨を採取し、mRNA の回収を試みた。しかし mRNA の回収量が非常に少なく、増幅を行うも精度が悪かったため、軟骨を徒手的に削り、粉碎して mRNA を抽出した。cDNA マ

マイクロアレイ解析の結果、興味深いことに、HIF-1 の発現が変性、つまり酸素濃度が上昇した状態で減少していることが分かった。HIF-1 関連遺伝子も同様に減少しており、変性に伴い酸素濃度が上昇し、HIF-1 の発現が低下した可能性が示唆された。また HIF-1 によって制御されることが知られているアポトーシス関連遺伝子もいくつか発現が上昇しておりこれらを in vitro で機能解析することとした。

3) 候補分子の in vitro 機能解析

まずは関節軟骨において HIF-1 の減少による遺伝子発現の変化から解析した。siRNA や HIF-1 のアンタゴニストである 2ME2 を用いて HIF-1 を抑制すると変性マーカーである MMP-13, MMP-3 の発現など上昇した。また 2) で発現上昇が見られたアポトーシス関連遺伝子も同様に上昇していた。逆に HIF-1 を低酸素下に矯正発現させると逆の現象が見られた。凍結切片を用いて、免疫組織染色を行うと、HIF-1 の発現が加齢や変性ととも減少し、酸素濃度分布と相関があった。また変性マーカーである MMP-13 や MMP-3 の発現は HIF-1 の発現低下部位に一致して上昇していた。

これらの結果より、変性により関節軟骨の酸素濃度が上昇し、HIF-1 の発現が抑制されることで変性マーカーが上昇する可能性が示唆された。今後は HIF-1 のノックアウトマウスを用いて更なる解析を予定している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 岡田慶太
『関節軟骨の形成・維持における HIF-1 の機能解析』
日本軟骨代謝学会 東京 平成 27 年 3 月 6 日

2. 岡田慶太
『関節軟骨の形成・維持における HIF-1 の機能解析』
日本整形外科学会基礎学術集会 鹿児島
平成 26 年 10 月 9 日

3. Keita Okada
HIF-1 IS ESSENTIAL FOR ARTICULAR CARTILAGE HOMEOSTASIS THROUGH INDUCTION OF ANABOLIC FACTORS AND SUPPRESSION OF CATABOLIC FACTORS
ASBMR Houston, USA 平成 26 年 9 月 12、13 日

4. 岡田慶太
『関節軟骨の形成・維持における HIF-1 の機能解析』
運動器科学研究会 東京 平成 26 年 9 月 6 日

5. 岡田慶太
『関節軟骨の形成・維持における HIF-1 の機能解析』
日本骨代謝学会 大阪 平成 26 年 7 月 21 日

6. Keita Okada
HIF-1 REGULATES CONFIGURATION AND MAINTENANCE OF ARTICULAR CARTILAGE THROUGH INDUCTION OF ANABOLIC FACTORS AND SUPPRESSION OF CATABOLIC FACTORS
OARSI Paris, France 平成 26 年 4 月 26 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
竹下 克志 (TAKESHITA, Katsushi)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号：30262009

(2) 研究分担者
門野 夕峰 (KADONO, Yuho)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：70401065
武富 修治 (TAKETOMI, Shuji)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：70401065

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4) 研究協力者
岡田 慶太 (OKADA, Keita)